



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①2 Offenlegungsschrift  
①0 DE 43 07 736 A 1

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
G 01 N 27/447  
B 01 D 57/02  
G 01 D 1/00

②1 Aktenzeichen: P 43 07 736.6  
②2 Anmeldetag: 11. 3. 93  
④3 Offenlegungstag: 23. 9. 93

DE 4307736 A 1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
13.03.92 JP 4-55359

⑦1 Anmelder:  
Olympus Optical Co., Ltd., Tokio/Tokyo, JP

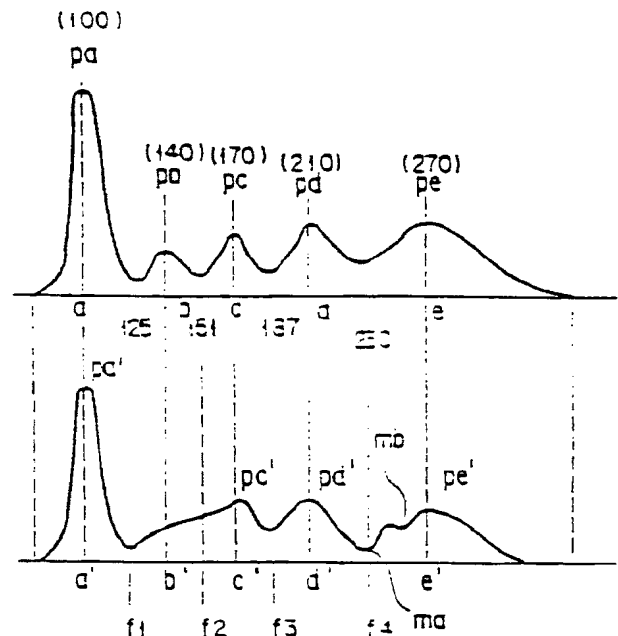
⑦4 Vertreter:  
Kuhnen, R., Dipl.-Ing.; Wacker, P., Dipl.-Ing.  
Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Fürniß, P., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Brandl, F., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,  
85354 Freising; Hübner, H., Dipl.-Ing., Rechtsanw.,  
8050 Freising; Winter, K., Dipl.-Ing.; Roth, R.,  
Dipl.-Ing.; Röß, W., Dipl.-Ing.Univ.; Kaiser, J.,  
Dipl.-Chem.Univ.Dr.rer.nat.; Pausch, T.,  
Dipl.-Phys.Univ.; Hess, P., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,  
85354 Freising

⑦2 Erfinder:  
Yokogawa, Hisamitsu, Hachioji, Tokio/Tokyo, JP

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zum Verarbeiten eines Fraktionsbilds bei der Elektrophorese

⑤7 Bei dem beschriebenen Verfahren wird ein elektrophoretisches Muster, das durch Elektrophorese-Behandlung eines normalen menschlichen Serums erhalten wurde, derart normalisiert, daß Referenzpunkte (pa, pb), die mit zumindest zwei vorbestimmten Elektrophorese-Entwicklungslängen bei einem elektrophoretischen Bild verknüpft sind, erfaßt werden. Diese Referenzpunkte werden so eingestellt, daß sie mit vorbestimmten Datenpositionen (100, 200), die mit den vorbestimmten Elektrophorese-Entwicklungslängen verknüpft sind, egalisiert sind. Ein Meßmuster, das dadurch erhalten wird, daß eine Probe einer Elektrophorese unterzogen wird, wird in gleicher Weise normalisiert. Ein minimaler Punkt des Meßmusters zwischen Spitzenpositionen des Referenzmusters wird erfaßt und Positionen von Fraktionierungspunkt-Positionen (f<sub>1</sub>, f<sub>2</sub>, f<sub>3</sub>, f<sub>4</sub>) zwischen Fraktionen (a', b', c', d', e') im Meßmuster werden auf der Basis der Erfassungsergebnisse bestimmt. Gemäß dieser Erfindung können die Positionen des Fraktionierungspunkts des Musters exakt innerhalb eines kurzen Zeitintervalls ohne jegliche Einflüsse aufgrund von Veränderungen der Entwicklungslängen oder Elektrophorese-Positionen zwischen den Proben bestimmt werden.



Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 07. 93 308 038/713

13/47

DE 4307736 A 1

Serums verglichen wird, um einen normalen Fraktionierungspunkt zu erhalten (dieses Verfahren wird im folgenden als ein viertes herkömmliches Verfahren bezeichnet).

Die vorstehend beschriebenen herkömmlichen Verfahren zum Verarbeiten von Fraktionsbildern bringen die folgenden Probleme mit sich.

Bei dem ersten herkömmlichen Verfahren wird dann, wenn die Anzahl normaler Fraktionen als fünf definiert ist, lediglich eine Verarbeitung zur Reklassifizierung bzw. geänderten Unterteilung der in sechs oder mehr Fraktionen fraktionierten Abtastwerte in die fünf Fraktionen durchgeführt. Eine Probe, deren Muster in vier oder weniger Fraktionen fraktioniert ist, kann nicht verarbeitet werden.

Da bei dem zweiten herkömmlichen Verfahren eine normale Probe aus allen Proben anstelle des Standard-Serums benutzt wird, kann dieses Verfahren nicht eingesetzt werden, wenn in allen Proben keine normale Probe enthalten ist.

Ein dem ersten, zweiten und dritten herkömmlichen Verfahren gemeinsames Problem besteht darin, daß, wenn beispielsweise der elektrophoretische Strom nicht gleichförmig ist, d. h. wenn die Komponenten der Proben unterschiedlich sind oder wenn Vorverarbeitungsvorgänge der Proben gegenseitig unterschiedlich sind, Veränderungen in der Länge  $x$  (als Entwicklungslänge bezeichnet) bei elektrophoretischen Bildern von Proben 11 auftreten, wie dies in Fig. 2 gezeigt ist. Zusätzlich wird, wie in Fig. 3 dargestellt ist, die Referenzposition des Referenzmusters gegenüber dem entsprechenden Spitzenwert oder minimalen Punkt der Probe verschoben, wenn die Positionen von Bändern von Proben 21 gegenseitig unterschiedlich sind (diese Positionen werden im folgenden als Elektrophorese-Positionen bezeichnet). Als Ergebnis kann kein Fraktionierungspunkt korrekt bestimmt werden.

Im Gegensatz hierzu treten bei dem vierten herkömmlichen Verfahren die vorgenannten Probleme nicht auf, da das Verhältnis des Abstands zwischen den Spitzenwerten oder minimalen Punkten unabhängig von der Entwicklungslänge und der Elektrophorese-Position vorbestimmt ist. Da jedoch die arithmetische Verarbeitung in Einheiten von Fraktionen wiederholt wird, benötigt die Fraktionsverarbeitung viel Zeit.

Es ist eine Aufgabe vorliegender Erfindung, ein Verfahren zum Verarbeiten eines Fraktionsbilds bei der Elektrophorese zu schaffen, das frei von Einflüssen aufgrund von Veränderungen der Entwicklungslängen oder der Elektrophorese-Positionen zwischen Proben ist und das eine Position eines Fraktionierungspunkts eines Musters innerhalb eines relativ kurzen Zeitintervalls genau bestimmen kann.

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein Verfahren zum Verarbeiten eines Fraktionsbilds bei der Elektrophorese geschaffen, das die Schritte aufweist: Vorbereitung bzw. Erstellung eines Referenzmusters mit einem Fraktionierungspunkt und einer Spitze, die als Referenzpunkte dienen; Normalisieren eines Meßmusters, das dadurch erhalten wird, daß eine Probe einer Elektrophorese-Bearbeitung unterzogen wird; und Fraktionieren des Meßmusters auf der Basis einer Position eines resultierenden Fraktionierungspunkts, der derart erhalten wird, daß eine Position eines Fraktionierungspunkts im Referenzmuster als eine Referenzposition eingesetzt wird, wobei jeder Fraktionierungspunkt im Referenzmuster dazu gebracht wird, einem Fraktionspunkt im Meßmuster zu entsprechen.

Zusätzliche Aufgaben und Vorteile der Erfindung erschließen sich aus der nachfolgenden Beschreibung und sind teilweise auch aus dieser ersichtlich oder können bei Nacharbeitung der Erfindung in Erfahrung gebracht werden. Die Aufgaben und Vorteile der Erfindung können mit Hilfe der technischen Merkmale und Kombinationen realisiert und erhalten werden, wie sie insbesondere in den beigefügten Ansprüchen herausgestellt sind.

In den beigefügten Zeichnungen, die hiermit in die Beschreibung eingegliedert werden und einen Teil derselben darstellen, ist ein derzeit bevorzugtes Ausführungsbeispiel der Erfindung gezeigt. Die Zeichnungen dienen zusammen mit der vorstehenden allgemeinen Beschreibung und der nachstehenden detaillierten Beschreibung des bevorzugten Ausführungsbeispiels zur Erläuterung der Prinzipien vorliegender Erfindung. Es zeigen:

Fig. 1 eine Ansicht eines Referenzmusters bei einem herkömmlichen Fraktionsverarbeitungsverfahren,

Fig. 2 eine Ansicht eines elektrophoretischen Bilds, bei dem Veränderungen der elektrophoretischen Entwicklungslängen aufgetreten sind,

Fig. 3 eine Darstellung zur Erläuterung eines elektrophoretischen Bilds, bei dem Veränderungen der Elektrophorese-Positionen aufgetreten sind,

Fig. 4 eine Darstellung eines Teils einer Anordnung eines Densitometers eines Elektrophorese-Geräts, das bei einem in Übereinstimmung mit vorliegender Erfindung stehenden Verfahren zum Verarbeiten eines Fraktionsbilds bei der Elektrophorese eingesetzt wird,

Fig. 5 eine Darstellung zur Erläuterung einer Abtastrichtung eines elektrophoretischen Bilds bei dem in Fig. 4 gezeigten Elektrophorese-Gerät,

Fig. 6 ein Blockschaltbild der Anordnung eines Hauptteils einer Datenverarbeitungseinheit des in Fig. 4 gezeigten Elektrophorese-Geräts,

Fig. 7 ein Ablaufdiagramm, das Schritte bei der Normalisierungsverarbeitung eines Musters bei dem erfindungsgemäßen Verfahren veranschaulicht,

Fig. 8 eine Darstellung eines densitometrischen Musters zur Erläuterung eines Verfahrens zur Erfassung eines Referenzpunkts bei dem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung,

Fig. 9A eine Darstellung eines Referenzmusters des elektrophoretischen Bilds, und Fig. 9B eine Darstellung eines Meßmusters des elektrophoretischen Bilds, und

Fig. 10 ein Ablaufdiagramm, das eine Abfolge zur Bestimmung der Position eines Fraktionierungspunkts bei dem Verfahren gemäß vorliegender Erfindung zeigt.

Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf bevorzugte Ausführungsbeispiele näher beschrieben. Eine Position eines Fraktionierungspunkts und einer Spitze werden als X-Achsenpunkte, die jeweils einem Fraktionierungspunkt eines Musters und einem Dichtewert der Spitze, d. h. Punkten im Muster, entsprechen, definiert. Bei einem mit Elektrophorese arbeitenden Fraktionsverarbeitungsverfahren gemäß vorliegender Erfindung wird eine Normalisierung eines Musters (das im folgenden als Meßmuster bezeichnet wird), das durch Elektrophoresebehandlung einer Probe erzielt wurde, in Übereinstimmung mit einem Verfahren zum Verarbeiten eines elektrophoretischen Musters durchgeführt, wie es in der japanischen ungeprüften Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 62-42034 beschrieben ist. Genauer gesagt, werden Referenzpunkte, die mit zumindest zwei vorbestimmten Elektrophorese-Entwicklungslängen bei einem elektrophoretischen Bild verknüpft sind, in einem Meßmuster erfaßt und es wird

gegeben bzw. vorgegeben, wie in Fig. 8 gezeigt ist. Eine Normalisierung wurde unter Heranziehung einer als Referenzpunkt dienenden Spitzenposition von Albumin (Alb), die stabil eine Spitze in dem elektrophoretischen Bild im Bereich von 100 Datenpunkten ausdrückt bzw. darstellt, und einer gleichfalls als Referenzpunkt dienenden Spitzenposition von  $\beta$ -Globulin ( $\beta$ -G) durchgeführt, die stabil eine Spitze im elektrophoretischen Bild im Bereich von 210 Datenpunkten ausdrückt bzw. darstellt.

Bei dem Ablaufdiagramm gemäß Fig. 7 werden Referenzpunkte, die den mit den vorbestimmten Elektrophorese-Entwicklungslängen verknüpften Spitzenpositionen von Alb und  $\beta$ -G entsprechen, aus den abgetasteten Daten der Proben erfaßt, die im Speicher 45 gespeichert sind. Die Referenzpunkte Alb und  $\beta$ -G werden wie folgt erfaßt. Beispielsweise werden, wie in Fig. 8 gezeigt ist, Daten  $L_1$  und  $L_2$ , die einen vorbestimmten Schwellwert überschreiten, derart herausgezogen, daß beide Endpunkte mit beiden Endpunkten des elektrophoretischen Bilds übereinstimmen, es wird das Vorhandensein/Fehlen von Spitzen innerhalb vorbestimmter Bereiche  $L_1$  und  $L_2$  erfaßt und Spitzen mit maximalen Dichten werden aus den erfaßten Spitzen ausgewählt und als die Spitzenwerte von Alb und  $\beta$ -G der Probe definiert, wodurch die Referenzpunkte bestimmt werden (51).

Die X-Achse des elektrophoretischen Bilds wird derart normalisiert, daß die erfaßten Spitzenpositionen gleich sind den mit der vorbestimmten Elektrophorese-Entwicklungslänge auf der X-Achse verknüpften Datenpositionen von Alb und  $\beta$ -G (52).

Eine Y-Achsen-Normalisierung des elektrophoretischen Bilds wird auf der Basis des Verhältnisses der Nummer bzw. der Anzahl von Daten der Probe zur Nummer bzw. Anzahl von Datenpunkten als Referenzpunkt auf der X-Achse durchgeführt, derart, daß der integrierte Wert der Werte der Abtastdaten auf der normalisierten X-Achse gleich groß wird wie derjenige zwischen Abtastdaten-Positionen, die dem integrierten Wert entsprechen (53).

Eine Dichte-Normalisierungsverarbeitung zum Einstellen des integrierten Werts jeder Fraktion derart, daß sie dem absoluten Wert der Dichte entspricht, wird durchgeführt. Der integrierte Wert der Alb-Fraktion für die normalisierten Daten wird gebildet und das Verhältnis von diesem zu einem Referenz-Integrationswert, der separat vom integrierten Wert auf den bzw. der normalisierten Daten vorbereitet wurde und dem durch eine biochemische Einheit gemessenen Alb-Dichtewert entspricht, wird gebildet. Dieses Verhältnis wird mit dem Datenwert jedes Punkts multipliziert, wodurch die Dichte-Normalisierung abgeschlossen ist (54).

Eine Fraktionsverarbeitung zur Bestimmung der Positionen von Fraktionierungspunkten des Meßmusters wird unter Einsatz des vorstehend beschriebenen Normalisierungs-Verfahrens durchgeführt.

Ein normales menschliches Serum wird einer Elektrophorese unterzogen und das resultierende elektrophoretische Bild wird photometrisch abgetastet, wodurch ein densitometrisches Muster erhalten wird. Dieses densitometrische Muster wird in Übereinstimmung mit dem Normalisierungs-Verfahrensverfahren normalisiert, um ein in Fig. 9A gezeigtes Referenzmuster zu erhalten. Bei diesem Ausführungsbeispiel werden zwei Referenzpunkte für die Normalisierung als eine Spitze  $pa$  einer Fraktion  $a$  und als eine Spitze  $pd$  einer Fraktion  $d$  definiert und eine Normalisierung wird durchgeführt, um zu erreichen, daß die Nummern bzw. Anzahlen von Datenpunkten 100 bzw. 210 sind.

Die durch die Normalisierung erhaltenen Spitzenpositionen waren 100 für  $pa$ , 140 für  $pb$ , 170 für  $pc$ , 210 für  $pd$  und 270 für  $pe$ . Die Positionen des Fraktionierungspunkts waren 125 zwischen  $pa$  und  $pb$ , 151 zwischen  $pb$  und  $pc$ , 187 zwischen  $pc$  und  $pd$  und 230 zwischen  $pd$  und  $pe$ . Diese Werte dienen als die Referenzpositionen bei der nachfolgenden Fraktionsverarbeitung und werden bzw. wurden im Speicher 45 gespeichert.

Das als Probe dienende Serum eines Patienten wird einer Elektrophorese unterzogen und das resultierende elektrophoretische Bild wird photometrisch abgetastet, um ein elektrophoretisches Muster zu erhalten. Das resultierende elektrophoretische Muster wird in Übereinstimmung mit dem vorstehend beschriebenen Normalisierungs-Verfahrensverfahren normalisiert, um ein in Fig. 9B gezeigtes Meßmuster zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt wird eine Spitze  $pa'$  einer Fraktion  $a'$  und eine Spitze  $pd'$  einer Fraktion  $d'$  als Referenzpunkte definiert. Obwohl dieses Muster fünf Fraktionen besitzt, sind die Positionen von Fraktionierungspunkten keine vorgeschriebenen Positionen.

Die Positionen der Spitzen und der Fraktionierungspunkte des Referenzmusters werden als Referenzpositionen zur Bestimmung der Positionen von Fraktionierungspunkten des resultierenden Meßmusters in Übereinstimmung mit einem in Fig. 10 dargestellten Ablaufdiagramm eingesetzt.

Zuerst wird  $PEAK = 1$  eingegeben (61)

Die Anzahl minimaler Punkte  $m$  zwischen  $PEAK$  und  $PEAK + 1$  wird dann beurteilt (62) (im folgenden als Beurteilung bezeichnet). Die nachfolgende Verarbeitung wird in Übereinstimmung mit dieser Beurteilung durchgeführt.

i) Falls lediglich ein minimaler Punkt  $m$  vorhanden ist, wird eine diesem minimalen Punkt  $m$  entsprechende X-Achsenposition als die Position des Fraktionierungspunkts bestimmt (als Verarbeitung I bezeichnet; 63). Wenn beispielsweise bei dem in Fig. 9B gezeigten Meßmuster der minimale Punkt  $m$  zwischen den Spitzen  $pa$  und  $pb$ , d. h. zwischen dem 100-Datenpunkt und dem 140-Datenpunkt, gesucht wird, ist ein minimaler Punkt vorhanden. Die diesem minimalen Punkt  $m$  entsprechende X-Achsenposition wird als ein Fraktionierungspunkt  $f_1$  zwischen den Fraktionen  $a'$  und  $b'$  definiert. Lediglich ein minimaler Punkt  $m$  ist zwischen den Spitzen  $pc$  und  $pd$ , d. h. den 170- bis 210-Datenpunkten, vorhanden. Die diesem minimalen Punkt  $m$  entsprechende X-Achsenposition wird als ein Fraktionierungspunkt  $f_3$  zwischen den Fraktionen  $c'$  und  $d'$  definiert.

ii) Falls eine Mehrzahl von minimalen Punkten  $m$  vorhanden ist, wird eine X-Achsen-Position, die dem minimalen Punkt, der am nächsten beim Fraktionierungspunkt des Referenzmusters liegt, entspricht, als der Fraktionierungspunkt definiert (als Verarbeitung II bezeichnet; 64). Wenn beispielsweise bei dem in Fig. 9B gezeigten Meßmuster minimale Punkte  $m$  zwischen dem 210-Datenpunkt und dem 270-Datenpunkt gesucht werden, sind zwei minimale Punkte  $ma$  und  $mb$  vorhanden. Die X-Achsen-Position, die dem näher beim Fraktionierungspunkt (230-Datenpunkt) des vorbestimmten Referenzmusters liegenden minimalen Datenpunkts  $ma$  entspricht, wird als ein Fraktionierungspunkt  $f_4$  zwischen den Fraktionen  $d'$  und  $e'$  definiert.

punkt, oder

iii) wenn keine gezählten minimalen Punkte vorhanden sind, Hinzufügen (65) der Position des entsprechenden Fraktionierungspunkts im Referenzmuster als den Fraktionierungspunkt. 5

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verarbeitung des Fraktionsbilds, das durch Elektrophorese-Bearbeitung eines Serums erhalten wurde, durchgeführt wird. 10

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Referenzmuster ein densitometrisches Muster ist, das durch Elektrophorese-Bearbeitung eines Standard-Serums erhalten wurde.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, 15  
dadurch gekennzeichnet, daß das Referenzmuster ein densitometrisches Muster ist, das durch Elektrophorese-Behandlung eines normalen menschlichen Serums erhalten wurde.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, 20  
dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine der Positionen der Fraktionierungspunkte von Fraktionen Albumin,  $\alpha_1$ -Globulin,  $\alpha_2$ -Globulin,  $\beta$ -Globulin und  $\gamma$ -Globulin des Referenzmusters als der Referenzpunkt definiert wird. 25

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch den weiteren Schritt der Berechnung von Fraktionsdaten für jede Fraktion des Meßmusters. 30

---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

35

40

45

50

55

60

65



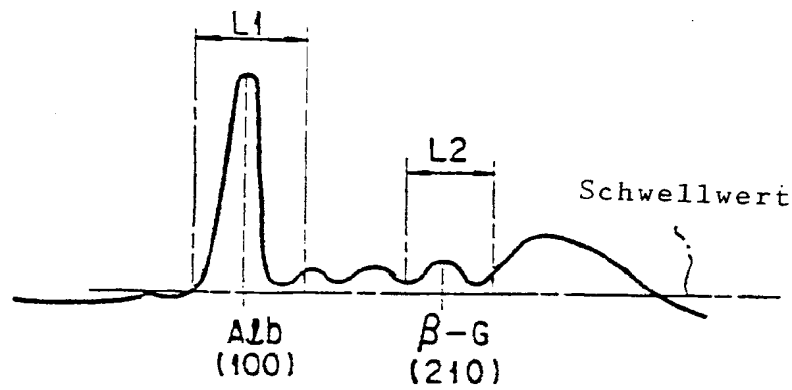


FIG. 8

